

③ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 37 936 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
A 61 K 47/46
A 61 K 47/48

⑰ Aktenzeichen: 196 37 936.9
⑲ Anmeldetag: 17. 9. 96
⑳ Offenlegungstag: 9. 4. 98

DE 196 37 936 A 1

⑦ Anmelder:
Lehr, Claus-Michael, Prof.Dr., 66125 Saarbrücken,
DE; Chmiel, Horst, Prof. Dr.-Ing.habil., 71229
Leonberg, DE

⑫ Erfinder:
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Arzneistoffzubereitung mit natürlicher bioadhäsiver Komponente

⑤⑦ Beschrieben wird eine Arzneistoffzubereitung zur Applikation auf Schleimhäuten mit wenigstens einem Wirkstoff und wenigstens einer natürlichen bioadhäsiven Komponente, die eine Haftwirkung an der zur Applikation vorgesehenen Schleimhaut aufweist, wodurch der Wirkstoff an die Schleimhaut anlagerbar ist. Dadurch weist der Wirkstoff eine verlängerte Verweildauer am Absorptions- und/oder Wirkort auf. Die Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß die natürliche bioadhäsive Komponente einen zelladhäsiven Mikroorganismus aufweist.
Weiterhin wird eine Arzneistoffzubereitung zur Applikation auf Schleimhäuten mit wenigstens einer natürlichen bioadhäsiven Komponente, die eine Haftwirkung an der zur Applikation vorgesehenen Schleimhaut aufweist, beschrieben, deren natürliche bioadhäsive Komponente einen zelladhäsiven Mikroorganismus aufweist, wobei der Mikroorganismus genetisch derart verändert ist, daß er während oder vor der Applikation wenigstens einen Wirkstoff selbst produziert.

DE 196 37 936 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Zubereitungen von Arzneistoffen mit natürlicher bioadhäsiver Komponente. Unter Bioadhäsion ist die Eigenschaft bestimmter Materialien zu verstehen, sich an lebende Oberflächen anzulagern. Arzneistoffzubereitungen mit bioadhäsiver Komponente werden insbesondere eingesetzt, um eine Haftung des Arzneistoffes an der zur Applikation vorgesehenen Schleimhaut zu erreichen und somit die Verweildauer des Arzneistoffes am Absorptions- und/oder Wirkort zu verlängern.

Die biologische Verfügbarkeit von Arzneistoffen, d. h. das Ausmaß und die Geschwindigkeit ihres Vorliegens am Wirkort bzw. im zentralen Blutkreislauf, ist insbesondere von der Eigenschaft eines bestimmten Arzneistoffs, biologische Barrieren, wie beispielsweise Schleimhautgewebe, zu überwinden bzw. dort einzudringen, abhängig. Hierbei sind die Konzentration des Arzneistoffs am Absorptionssort, sowie die Zeitdauer, die der Arzneistoff in der Nähe dieser Schleimhaut für die Absorptionsvorgänge zur Verfügung steht, die entscheidenden Faktoren. Bei Arzneistoffen, die zur Entfaltung ihrer Wirkung nicht systemisch absorbiert werden müssen (z. B. lokal wirksame antiinflammatorische Stoffe, Antibiotika oder Antimykotika), ist allein ihre Verweildauer am Anwendungs- bzw. Wirkort von Bedeutung.

Grundsätzlich ist zu unterscheiden zwischen Arzneistoffen, die oral angewendet werden und als Absorptions- bzw. Wirkort die Magen-Darm-Schleimhaut aufweisen, und solchen, die auf anderen Schleimhäuten, wie der Nasen-, der Augen-, der Mund-, der rektalen oder der vaginalen Schleimhaut, lokal oder systemisch angewendet werden.

Oral anzuwendende Arzneistoffe weisen hauptsächlich zwei unterschiedliche Wirkungsmechanismen auf. Im einen Falle werden sie am Applikationsort, der Magen-Darm-Schleimhaut, absorbiert, um in den zentralen Blutkreislauf zu gelangen und dort eine systemische Wirkung zu entfalten. Im anderen Falle sollen sie innerhalb des Magen-Darm-Kanals, der in diesem Fall den Wirkort darstellt, eine lokale, die Schleimhaut selbst oder den Inhalt des Lumens betreffende pharmakologische Wirkung ausüben.

Auch bei den Arzneistoffen, die auf anderen Schleimhäuten als der Magen-Darm-Schleimhaut angewendet werden, insbesondere auf der Schleimhaut der Nase, des Auges, des Mundes, des Rektums oder der Vagina, existieren solche, die nach der Applikation eine lokale Wirkung entfalten, und solche, die nach der Applikation absorbiert werden, um eine systemische pharmakologische Wirkung auszuüben.

Diese Arzneistoffe, die direkt oder mittels dafür vorgesehenen Applikatoren auf der betreffenden Schleimhaut angewendet werden können, um dort absorbiert zu werden oder ihre Wirkung zu entfalten, werden in ihrer Arzneistoffwirkung nicht durch eine schlechte Zugänglichkeit der Schleimhaut eingeschränkt.

Jedoch ist auch bei diesen Arzneistoffen die Verweildauer am Absorptions- bzw. Wirkort entscheidend für die Wirksamkeit. So wird beispielsweise ein am Auge applizierter Arzneistoff innerhalb weniger Minuten durch die Tränenflüssigkeit verdünnt und ausgespült. Die Wirkstoffkonzentration, die sowohl für die lokale Wirksamkeit, als auch für die Absorption des Arzneistoffes in den Blutkreislauf entscheidend ist, fällt rasch ab.

Es besteht also bei allen genannten Arzneistoffen, sowohl den oral, als auch den direkt auf den jeweiligen Schleimhäuten anzuwendenden, der Wunsch, die biologische Verfügbarkeit durch eine Verlängerung der Verweildauer des Arzneistoffes am Absorptions- und/oder Wirkort zu verbessern.

Diese verlängerte Kontaktzeit zwischen Schleimhaut und Arzneistoff führt zu einer verbesserten Resorption oder einer größeren Wirkkonzentration des Arzneistoffes am Absorptions- bzw. Wirkort im Vergleich zu bekannten Arzneistoffzubereitungen mit vergleichbarem Wirkstoffgehalt. Somit kann die notwendige Arzneistoffmenge in der Arzneistoffzubereitung verringert werden, wodurch Nebenwirkungen des Arzneistoffs minimiert oder vermieden werden können. Auch die Kosten der Arzneistoffzubereitung können durch die Reduktion der Arzneistoffmenge in der Arzneistoffzubereitung gesenkt werden. Ferner kann mit einer Arzneistoffkonzentration, die der Konzentration von den Zubereitungen des Standes der Technik entspricht oder gegenüber dieser erhöht ist, die Dosierungshäufigkeit reduziert werden und somit eine verbesserte Patientenkompliance erreicht werden.

Um die Verweildauer von Arzneistoffen am Absorptions- und/oder Wirkort zu verlängern, stehen bereits seit einigen Jahren sogenannte Retard- oder controlled release-(CR-)Zubereitungen zur Verfügung, welche unter Verwendung verschiedener Technologien, wie beispielsweise das Überziehen mit oder Einbetten in geeignete Polymere, den Arzneistoff verzögert freisetzen. Der Nachteil von CR-Zubereitungen ist jedoch, daß die Verweilzeit der Zubereitung selbst am Absorptions- bzw. Wirkort nicht verlängert wird, sondern nur die Zeitspanne der Freisetzung des Arzneistoffs. Diese Verweilzeit der CR-Zubereitung am Absorptions- bzw. Wirkort, die für die pharmazeutische Wirksamkeit ausschlaggebend ist, ist jedoch durch physiologische Vorgänge relativ kurz. So werden z. B. okular applizierte flüssige oder kolloidale Zubereitungen in der Regel innerhalb weniger Minuten durch die Tränenflüssigkeit ausgeschieden. Innerhalb des Gastrointestinaltrakts (GI-Trakt) ist die Verweilzeit von oral applizierten Zubereitungen normalerweise insgesamt nicht länger als 24 Stunden. Die mittlere Verweilzeit einer Zubereitung innerhalb des Dünndarms, dem Ort an dem die meisten Arzneistoffe absorbiert werden, liegt sogar nur bei etwa 3 Stunden.

Aus der PCT/VO 85/02092 ist es bekannt, die Verweilzeit von CR-Zubereitungen am Absorptions- und/oder Wirkort zu verlängern und auch den Transport von schlecht absorbierbaren Arzneistoffen (insbesondere Peptiden und Proteinen) durch das Epithel zu verbessern, indem sog. bioadhäsive Arzneistoffzubereitungen verwendet werden. In dieser Veröffentlichung wird die Verwendung synthetischer Polymere mit muco- oder bioadhäsiven Eigenschaften beschrieben, wie z. B. quervernetzte Polymere der Acryl- und Methacrylsäure. Diese Polymere bewirken durch ihre wasserunlöslichen und quellbaren Eigenschaften eine Haftung des Arzneistoffes an der Haut oder Schleimhaut und sollen somit die Zeitspanne des Kontakts zwischen Arzneistoff und Haut bzw. Schleimhaut verlängern. Das Problem der Verwendung solcher synthetischer Bioadhäsiva liegt jedoch darin, daß die Wechselwirkung mit dem biologischen Substrat, wie beispielsweise die Oberfläche von Epithelzellen oder die auf solchen aufliegende Mucus-schicht, lediglich auf nichtspezifischen, physikalisch-chemischen Wechselwirkungen, wie z. B. H-Brücken, van

der Waals-Kräften oder hydrophoben Wirkungen, beruht. Diese Zubereitungen weisen aufgrund der unspezifischen Bindung unter anderem den Nachteil auf, daß sie durch Wechselwirkungen mit anderen Materialien als den Haut- bzw. Schleimhautzellen am Absorptions- bzw. Wirkort, wie z. B. Schleim, Mikroorganismen oder Nahrungsbestandteilen gebunden und somit inaktiviert werden, noch ehe sie die Schleimhaut erreichen. Darüber hinaus beträgt die mittlere Erneuerungsgeschwindigkeit (turnover time) der intestinalen Mucusschicht nur wenige Stunden, so daß selbst durch effektive Mucocohäsion die Haftungszeit eines solchen Systems an den Zellen der Mucosa letztlich auf diesen relativ kurzen Zeitraum der Erneuerung begrenzt bleibt.

Um die genannten Nachteile der synthetischen Mucoadhäsiva zu überwinden, wird in der PCT/WO 90/09963 ausgeführt, statt synthetischen Materialien natürliche Bioadhäsiva zu verwenden. Natürliche Bioadhäsiva im Sinne dieser Anmeldung sind Materialien, die aus der äußeren Oberfläche von Mikroorganismen isoliert werden und an der Darmwand haften, sowie synthetisch hergestellte Varianten, Analoga oder Fragmente solcher Materialien. Dort werden insbesondere die Oberflächenproteine verschiedener E. Coli Stämme, die in Fimbrien oder Pili dieser Stämme enthalten sind, als natürliche Bioadhäsiva näher beschrieben.

Obwohl die Verwendung spezifischer Bioadhäsiva im Sinne von bakteriellen Adhäsionsfaktoren, in vitro und in einigen Tierversuchen vielversprechende Resultate gezeigt haben, haben sich bei der Weiterentwicklung dieses Konzepts Schwierigkeiten gezeigt. Die Verwendung von isolierten Adhäsionsfaktoren ist aus noch unerforschten Gründen offenbar nicht geeignet um in vivo dauerhafte Bioadhäsion herbeizuführen, wie sie bei lebenden, vermehrungsfähigen Mikroorganismen beispielsweise in der Darmwand beobachtet werden kann.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Arzneistoffzubereitungen zur Verfügung zu stellen, die eine dauerhafte Bioadhäsion und eine verlängerte Verweildauer am Absorptions- und/oder Wirkort aufweisen, und die die genannten Nachteile der bekannten natürlichen und synthetischen Bioadhäsiva, wie beispielsweise die unspezifische Anheftung an unterschiedliche Substrate, umgehen.

Dies wird erfindungsgemäß durch eine Arzneistoffzubereitung zur Applikation auf Schleimhäuten mit wenigstens einem Wirkstoff und wenigstens einer natürlichen bioadhäsiven Komponente erreicht, die eine Haftwirkung an der zur Applikation vorgesehenen Schleimhaut aufweist, wodurch der Wirkstoff an die Schleimhaut anlagerbar ist, wobei die natürliche bioadhäsive Komponente einen zelladhäsiven Mikroorganismus aufweist.

Hierbei ist es für die erfindungsgemäß verbesserte Haftwirkung von besonderer Bedeutung, daß die natürliche bioadhäsive Komponente nicht, wie aus dem Stand der Technik bekannt, isolierte Fragmente eines Mikroorganismus aufweist, sondern den Mikroorganismus selbst als einheitliche komplette Struktur, in der er auch in natürlicher Weise vorliegt.

Außerdem ist es Gegenstand der bezeichneten Erfindung, eine Arzneistoffzubereitung zur Verfügung zu stellen, die wenigstens eine bioadhäsive Komponente aufweist, wobei diese Komponente einen zelladhäsiven Mikroorganismus aufweist, der genetisch derart verändert worden ist, daß er mindestens einen Wirkstoff während oder vor der Applikation selbst produziert.

Es ist beispielsweise möglich, einen Insulin- oder auch

Vitamin-produzierenden Mikroorganismus, der bereits zum Stand der Technik gehört, mit einem zelladhäsiven Mikroorganismus, der für sich genommen ebenfalls bekannt ist, so zu kombinieren, daß ein genetisch veränderter Mikroorganismus resultiert, der die Eigenschaften beider eingesetzter Mikroorganismen vereint.

Der Wirkstoff der Arzneistoffzubereitung ist entsprechend der medizinischen Indikation der Zubereitung zu wählen. Dabei sind für die erfindungsgemäße Zubereitung grundsätzlich alle pharmakologisch wirksamen Stoffe geeignet, insbesondere:

a) kleinere Moleküle organisch-chemischen Ursprungs, wie beispielsweise Stoffe zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Erkrankungen des Endokrinsystems oder der Psyche, Antibiotika, Antimykotika oder Chemotherapeutika, insbesondere Stoffe aus folgenden Wirkstoffgruppen: hydroxylierte Kohlenwasserstoffe und deren Verbindungen;

Carbonylverbindungen, Mono- und Disaccharide;

aliphatische und aromatische Ether;

aliphatische und aromatische Carbonsäuren, sowie deren Ester, Lactone, Amide, Imide, Nitrile;

Aminosäuren, acylierte Aminosäuren, Aminocarbonsäuren, Aminosucker;

Kohlensäureester, wie z. B. Urethane, Thiourethane, Harnstoff und -derivate, Guanidinderivate, Hydantoine, Barbitur-, Thiobarbitursäurederivate;

aromatische und heteroaromatische Nitroverbindungen;

aliphatische und aromatische Amine, Phenylalkylamine, Hydroxyphenylethanolamine, quartäre Ammoniumverbindungen, Aminoglykoside;

Penicilline, Cephalosporine, Chloramphenicol, Polyen-Antibiotika;

Thiole, Sulfonsäureester, Sulfonamide;

Pyrazol-, Pyrazolidin-, Imidazol-, Imidazolin-, Pyridin-, Pyrimidin-, Piperidin-, Pyridazin-, Pyrazin-, Piperazin-, Indol-, Purin-, Xanthin-, Chinolin-, Isochinolin-, Chinazolin-, Triazin-, Benzopyridazin-, Pteridin-, Benzodiazepin-, Lysergsäurederivate, tricyclische N-Heterocyclen;

Thiadiazin-, Phenothiazinderivate;

Semicarbazone;

Cromoglicinsäure und deren Derivate;

Ethacridin;

Vitamine und deren Derivate;

b) natürlich oder biotechnologisch hergestellte Peptide, Peptidhormone und Proteine, wie beispielsweise Insulin, Calcitonin, Wachstumshormon, LHRH, Erythropoietin, Interferon, Granulocytenstimulierender Faktor, Tumor-Nekrose-Faktor, einschließlich der Derivate, Agonisten und Antagonisten dieser Stoffe, sowie auch Antigene zur Vakzinierung,

c) Oligo- oder Polynukleotide für gentherapeutische Anwendungen, wie beispielsweise Antisense-Nukleotide mit dem Ziel, die Erzeugung unerwünscht oder fehlerhaft exprimierter Proteine in Körperzellen zu blockieren, oder auch Gen-Vektoren (Plasmide), die in Körperzellen eingebracht werden, um dort die Expression von fehlenden oder fehlerhaften Genen zu korrigieren, oder therapeutisch indizierte Proteine (z. B. Tumor-Nekrose-Faktor, Interferone, Interleukine, u. a.) in den Körperzellen selbst zu erzeugen.

Der zelladhäsive Mikroorganismus der natürlichen bioadhäsiven Komponente, der die Arzneistoffzubereitung für längere Zeit an einer Schleimhautoberfläche des menschlichen Körpers befestigen soll, kann gemäß Anspruch 3 aus der Gruppe der natürlich vorkommenden, apathogenen Keime ausgewählt werden.

Hierbei sind natürlich vorkommende, apathogene Keime von einem Stamm der Spezies *Escherichia coli* nach Anspruch 4, oder solche aus der Gruppe der Milchsäurebakterien nach Anspruch 5 geeignet.

Ebenso ist es, entsprechend der Ausgestaltungsform, die in Anspruch 6 beschrieben ist, denkbar, einen natürlich vorkommenden, pathogenen Keim zu verwenden, bei dem die Expression der pathogenen Strukturen unterdrückt worden ist. Eine Attenuierung des Mikroorganismus, d. h. eine Abschwächung seiner pathogenen Eigenschaften, läßt sich durch Unterdrückung der Expression von pathogenen, beispielsweise toxischen Strukturen durch bestimmte Kulturbedingungen, genetische Veränderungen oder Selektion zufällig mutierter Klone erreichen.

Weiterhin ist es denkbar, einen ursprünglich vermehrungsfähigen Mikroorganismus durch geeignete Behandlung derart zu verändern, daß er in einer nicht mehr vermehrungsfähigen Form vorliegt. Dadurch kann ebenfalls die Pathogenität eines ursprünglich pathogenen Mikroorganismus soweit unterdrückt sein, daß er für die erfindungsgemäße Verwendung geeignet ist.

Sowohl zur Herstellung attenuierter, als auch zur Herstellung nicht mehr vermehrungsfähiger Mikroorganismen sei auf die gängigen Verfahren aus dem Stand der Technik hingewiesen, wie beispielsweise die Verfahren zur Verminderung der Keimzahl nach deutschem Arzneibuch, die aus der Lebensmittelindustrie bekannten Verfahren zur Entkeimung der Lebensmittel unter Anwendung von hohen Drücken oder die Verfahren der Pasteurisation bei der Milchaufbereitung.

Der Einsatz neuartiger Mikroorganismen, die durch Transfektion rekombinanter Gene in einen geeigneten Wirtsorganismus erhalten werden, als zelladhäsive Mikroorganismen der natürlichen bioadhäsiven Komponente nach Anspruch B ist eine weitere vorteilhafte Ausbildung der genannten Erfindung.

Eine entscheidende Bedeutung kommt auch der Art und Weise zu, in der die Kopplung des Wirkstoffs an den zelladhäsiven Mikroorganismus erfolgt. Durch diese Kopplungsart kann die Freisetzung des Wirkstoffs aus der Zubereitung zeitlich (z. B. langsam oder schnell) oder in Abhängigkeit von physiologischen Signalen (z. B. pH-Veränderungen, Konzentrationsveränderungen eines bestimmten Stoffes in Körperflüssigkeiten, etc.) kontrolliert werden. Technisch kann diese Kopplung auf unterschiedliche Arten erfolgen.

So ist es beispielsweise möglich, den zelladhäsiven Mikroorganismus im Sinne einer konventionellen Arzneiform, wie beispielsweise einer Tablette, einer Kapsel, eines Suppositorium oder einer Salbe, die den Wirkstoff, den Mikroorganismus und ein physikalisches und/oder chemisches Verbindungselement aufweist, zu verarbeiten. Dabei ist es wichtig, daß sich der Wirkstoff und der Mikroorganismus während der oder durch die bei der Anwendung der Zubereitung am Anwendungsort auftretenden Veränderungen (z. B. Quellung, Zerfall oder Auflösungsprozesse) nicht voneinander trennen, sondern mit Hilfe geeigneter physikalischer und/oder chemischer Maßnahmen hinreichend lange aneinander gekoppelt bleiben. Dabei ist eine Verarbeitung vorteilhaft,

bei der sich nach der Anwendung der Arzneiform unter Einfluß eines physiologischen Parameters, wie beispielsweise der Körpertemperatur oder einer Körperflüssigkeit, der Wirkstoff und der Mikroorganismus innig miteinander verbinden.

Ebenso ist eine physikalische, chemische oder biochemische Kopplung von Wirkstoff und Mikroorganismus ohne Verwendung eines physikalischen und/oder chemischen Verbindungselements gemäß Anspruch 8, 14 oder 15 möglich, die beispielsweise durch physikalische Adsorption, durch spezifische Rezeptor-Ligand bzw. Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen, oder kovalente chemische Bindung, wie beispielsweise eine Esterbindung, eine glykosidische Bindung, eine Etherbindung, eine Amin-, Imin- oder Amidbindung erfolgen kann.

Denkbare chemische und/oder physikalische Verbindungselemente sind beispielsweise die in der PCT/WO 85/02092 beschriebenen Polymere, die in der PCT/WO 90/04963 beschriebenen natürliche Bioadhäsiva oder weitere geeignete Hilfsstoffe, z. B. Spacer.

Besonders vorteilhaft ist auch die kovalente chemische Bindung des Wirkstoffs über einen bivalenten Antikörper, der Bindungsstellen für den zelladhäsiven Mikroorganismus und den Wirkstoff aufweist.

Eine weitere vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung ist auch der Zusatz von Hilfsstoffen zu der Arzneistoffzubereitung. Hierbei sind insbesondere, wie in Anspruch 16 beschrieben wird, Penetrationsverbesserer, wie Gallensäuren, Natriumdocylsulfat, Saponine, Azone, mittelkettige Triglyceride und Polyacrylsäure oder Enzyminhibitoren, wie Aprotinin, Bestatin, Puromycin, Bacitracin, Polyacrylsäure, EDTA, soybean trypsin-inhibitor oder Natriumglycocholat geeignet.

Durch den Einsatz von Penetrationsverbesserern kann das Durchdringen des Wirkstoffs durch die zur Anwendung gewählte Schleimhaut beschleunigt und somit die am Wirkort vorliegende Wirkstoffkonzentration erhöht werden. Mit dem Zusatz von Enzyminhibitoren wird eine Zersetzung des Wirkstoffs durch beispielsweise Verdauungsenzyme wie Proteasen verhindert, wodurch der Anteil an arzneilich wirksamem Wirkstoff steigt.

Sowohl der Zusatz von Penetrationsbeschleunigern, als auch der von Enzyminhibitoren ermöglicht eine Verringerung der Wirkstoffkonzentration in der Arzneizubereitung durch die Steigerung des Anteils von tatsächlich wirksamem Arzneistoff.

Sämtliche genannten Ausführungen beziehen sich selbstverständlich nicht nur auf einzelne Wirkstoffe, sondern sind in gleicher Weise auf Gemische von mindestens zwei Wirkstoffen anwendbar.

Das folgende Ausführungsbeispiel soll den Erfindungsgedanken ohne Einschränkung auf weitere Ausgestaltungsformen exemplarisch beschreiben.

Das Beispiel bezieht sich auf eine neue Zubereitung zur Behandlung intestinaler Mykosen, insbesondere Candidainfektionen. Die Zubereitung besteht aus einem antimykotischen Wirkstoff, einem zelladhäsiven Mikroorganismus und einem bioadhäsiven, hydrogel-bildenden Polymer, die gemeinsam als Pulvermischung in einer magensaftresistenten Kapsel appliziert werden.

Es wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß die Erfindung nicht auf peroral anzuwendende Zubereitungen begrenzt ist, sondern grundsätzlich für alle Gewebeoberflächen des Körpers (z. B. die Schleimhäute des Verdauungstraktes, des Respirationstraktes oder der Geschlechtsorgane, die Haut oder die Endothelien bestimmter innerer Organe oder Blutgefäße) anwend-

bar ist, welche für zelladhäsive Mikroorganismen ein geeignetes Substrat darstellen können. Ebenso ist die Magensaftresistenz der hier als Beispiel beschriebenen Kapselzubereitung in diesem speziellen Fall zwar sinnvoll, aber keinesfalls in allen Fällen derartiger oral anzuwendender Zubereitungen zwingend erforderlich.

Als Wirkstoff wird in diesem Beispiel das bekannte Polyen-Antimykotikum Nystatin eingesetzt. Die übliche Dosierung bei Anwendung einer handelsüblichen, konventionellen Tablettenzubereitung dieses Wirkstoffs (z. B. ADICLAIR, Ardeypharm GmbH, D-Herdecke) beträgt zwischen 1,5 bis 6 Mio. I.E., verteilt auf 3–12 konventionelle Tabletten pro Tag, über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen. In der neuen Zubereitung werden pro magensaftresistenter Kapsel ca. 1 Mio. I.E. eingesetzt.

Als zelladhäsiver Mikroorganismus werden in diesem Beispiel vermehrungsfähige Bakterien vom E. coli Stamm NISSLE 1917 eingesetzt. Dieser Mikroorganismus ist in der Lage die menschliche Darmschleimhaut zu besiedeln, zeigt aber keine Enterotoxin- oder Hämolysinbildung und ist weder enteroinvasiv noch urotroxisch. Die Unbedenklichkeit der oralen Anwendung dieses Mikroorganismus als gefriergetrocknete Trockenmasse vermehrungsfähiger Keime in einer magensaftresistenten Kapselzubereitung z. B. MUTAFLOR, Ardeypharm GmbH, D-Herdecke) ist durch klinische Studien belegt. Bedingt durch die Stoffwechselleistungen dieses Mikroorganismus, welche nach oraler Applikation eine positive Veränderung des Darmmilieus hervorrufen (u. a. Unterstützung des Kolonozytenstoffwechsels, Produktion von Vitamin K, Senkung des Redoxpotentials und Immunstimulation) hat sich dieser Bakterienstamm bei einer Reihe von Darmerkrankungen (z. B. akute Diarrhöe, chronisch rezidivierende Diarrhöe, chronische Obstipation, Reizcolon, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn u. a.) als wirksam erwiesen. Wegen seiner günstigen Wirkung auf die Darmflora wird die gleichzeitige Anwendung des E.Coli Stammes NISSLE 1917 auch zur Unterstützung einer antimykotischen Therapie von intestinalen Candida-Infektionen mit Nystatin empfohlen. In der neuen Zubereitung werden pro magensaftresistenter Kapsel 100 mg Biotrockenmasse mit 25×10^9 vermehrungsfähigen Bakterien E. coli Stamm NISSLE 1917 eingesetzt.

Die Kopplung des Wirkstoffs an den zelladhäsiven Mikroorganismus erfolgt durch ein bioadhäsives Polymer, insbesondere durch das für pharmazeutische Anwendungen zugelassene Carbomer. Carbomer besteht aus hochmolekularer Polyacrylsäure, ein handelsübliches Präparat ist CARBOPOL 934 P von BF Goodrich. Dieses wird als trockenes Pulver mit dem Wirkstoff Nystatin und den gefriergetrockneten, vermehrungsfähigen Keimen gemischt und gemeinsam in eine magensaftresistente Kapsel gefüllt. In der neuen Zubereitung werden pro magensaftresistenter Kapsel 500 mg CARBOPOL 934 P eingesetzt. Es sind jedoch auch andere Dosierungen und andere bioadhäsive Polymere (z. B. Cellulose-Derivate, Hyaluronsäure, Chitosan u. a.) möglich.

Funktionsweise der neuen Zubereitung:

Nach oraler Applikation der Kapsel mit einem Glas Wasser, Passage des Magens und Auflösung des Kapselüberzugs im Darm wird der Kapselinhalt vom Darmsaft benetzt. Dabei verwandelt sich das ursprünglich trockene Pulvergemisch aufgrund des starken Quellvermögens des bioadhäsiven Polymers (hier: Polyacrylsäure) in ein Hydrogel, aus welchem der Arzneistoff langsam

über einen Diffusionsprozeß freigesetzt wird. Die mucoadhäsiven Eigenschaften des Polymers allein würden zwar wegen der in der Einleitung erwähnten Gründen nicht zu einer dauerhaften Haftung an der Darmschleimhaut und verlängerten Darmpassage führen. Aber das Polymer vermag zuvor aufgrund seiner generellen bioadhäsiven Eigenschaften eine dauerhafte Bindung an die eigentliche bioadhäsive Komponente der Erfindung, nämlich die zelladhäsiven, vermehrungsfähigen Bakterien E.coli Stamm NISSLE 1917, herbeizuführen. Neu gegenüber bisherigen Anwendungen bioadhäsiver Polymere ist somit, daß diese nicht der Bindung einer Arzneiform an die Schleimhaut, sondern der Bindung eines Arzneistoffes an eine weitere lebende Oberfläche, nämlich an die von zelladhäsiven, vermehrungsfähigen Bakterien dient.

Diese erfindungsgemäße Zubereitung, die durch Kombination des Wirkstoffs, des zelladhäsiven Mikroorganismus (das Antimykotikum Nystatin und der zelladhäsive, vermehrungsfähige E.coli Stamm NISSLE 1917) und eines physikalischen und/oder chemischen Verbindungselements entsteht, weist gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Arzneiformen eine Reihe von Vorteilen auf:

Zum ersten führt die Kopplung des Arzneistoffes an eine bioadhäsive Komponente zu einer verlängerten Verweilzeit der Komponenten im Intestinaltrakt. Auf diese Weise bleibt die oral applizierte Dosis des Wirkstoffs Nystatin für längere Zeit am Ort der Wirkung als nach oraler Gabe einer konventionellen, nicht-bioadhäsiven Zubereitung. Somit werden über längere Zeiträume höhere Wirkstoffkonzentrationen erreicht und die Dosierung des Wirkstoffs aus der neuen bioadhäsiven Zubereitung kann gegenüber herkömmlichen Zubereitungen reduziert werden. Dadurch wird die Substanzbelastung für den Patienten und das Risiko des Auftretens von Nebenwirkungen verringert. Das Ausmaß der durch die neuartige Zubereitung möglichen Dosisreduktion ist durch klinische Studien festzustellen. Eine Beibehaltung der für konventionelle Zubereitungen üblichen Dosis ist jedoch aufgrund der guten Verträglichkeit aller Komponenten ebenfalls möglich, so daß diese Dosisoptimierung auch erst in klinischen Studien nach erfolgter Zulassung des Präparates (Phase IV) erfolgen kann.

Zum zweiten wird der Wirkstoff Nystatin von der Zubereitung verzögert freigesetzt, und zwar in der Weise, daß die gesamte applizierte Dosis von ca. 1 Mio. I.E. pro Dosierungseinheit langsam, innerhalb von 24 Stunden verfügbar wird. Bedingt durch die Kopplung an einen zelladhäsiven Mikroorganismus wird die Zubereitung an ihrem Wirkort (Darm lumen) festgehalten und eine vorzeitige Ausscheidung derselben verhindert. Dadurch wird eine Senkung der Dosierungsfrequenz des Arzneimittels von 3 mal täglich auf 1 mal täglich möglich. Dies führt wiederum zu einer Vereinfachung der Anwendung und damit zu einer Verbesserung des Therapieerfolges.

Zum dritten erfolgt mit der Einnahme lediglich einer oralen Arzneiform die gleichzeitige Applikation von Wirkstoff (Antimykotikum) und Mikroorganismus (E. coli Stamm NISSLE 1917). Diese Komponenten werden in der herkömmlichen Therapie gemeinsam verordnet, aber in jeweils getrennt voneinander formulierten Zubereitungen, einer Tablette plus einer Kapsel, appliziert. Die mit der Erfindung mögliche gleichzeitige Gabe beider Komponenten in einer Arzneiform ist für den Patienten einfacher und führt zu einer Verbesserung der

Compliance.

Weitere Anwendungsbeispiele der vorliegenden Erfindung, die eine Arzneistoffzubereitung mit einem zelladhäsiven Mikroorganismus aufweisen, sind beispielsweise:

- a) eine Formulierung zur lokalen Anwendung von Cytostatika, Tumor-Nekrose-Faktor oder Suizid-Genen zur Behandlung von Krebserkrankungen der Schleimhäute, wie beispielsweise das Gebärmutterhalskarzinom, durch Kopplung dieser Arzneistoffe an Mikroorganismen, die an der Schleimhaut des betroffenen Organs adhärieren oder dessen nähere Umgebung, wie beispielsweise die Vaginalschleimhaut oder den Cervikalschleim bevorzugen, 5
- b) eine Formulierung zur lokalen oder systemischen Applikation von Schmerzmitteln oder Lokalanästhetika durch Kopplung an Mikroorganismen, die spezifisch an der Bukkal- oder Gingivalschleimhaut adhärieren, 10
- c) eine Formulierung zur systemischen Applikation von Peptidhormonen, wie beispielsweise Insulin oder Interferon, durch Kopplung an Mikroorganismen, die bevorzugt das Colon besiedeln, 15
- d) eine Formulierung zur Behandlung entzündlicher Darmerkrankungen, wie beispielsweise Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn, durch Kopplung geeigneter antiinflammatorischer Arzneistoffe an Mikroorganismen, die bevorzugt entzündete Schleimhautareale besiedeln, 20
- e) eine Formulierung zur gentherapeutischen Behandlung entzündlicher Schleimhauterkrankungen, indem die vermehrte Bildung von Entzündungsmediatoren, wie Interleukinen, in den betroffenen Zellen durch geeignete Antisense-Oligonukleotide unterdrückt, oder deren Wirkung durch die kontrollierte Expression von antagonistisch wirksamen Proteinen moduliert wird, 25
- f) eine Formulierung zur Behandlung der zystischen Fibrose (Mucoviscidose), indem schleimlösende Arzneistoffe oder Enzyme, wie Acetylcystein oder DNase, an Mikroorganismen gekoppelt werden, die die Schleimhaut der Atemwege besiedeln, und 30
- g) eine Formulierung zum Einschleusen des CFTR-Genes in die Epithelzellen des Respirationstraktes von Mucoviscidose-Patienten durch Kopplung an Mikroorganismen, die die Schleimhaut der Atemwege besiedeln. 35

Patentansprüche

1. Arzneistoffzubereitung zur Applikation auf Schleimhäuten mit wenigstens einem Wirkstoff und wenigstens einer natürlichen bioadhäsiven Komponente, die eine Haftwirkung an der zur Applikation vorgesehenen Schleimhaut aufweist, wodurch der Wirkstoff an die Schleimhaut anlagerbar ist, dadurch gekennzeichnet, daß die natürliche bioadhäsive Komponente einen zelladhäsiven Mikroorganismus aufweist. 55
2. Arzneistoffzubereitung zur Applikation auf Schleimhäuten mit wenigstens einer natürlichen bioadhäsiven Komponente, die eine Haftwirkung an der zur Applikation vorgesehenen Schleimhaut aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die natürliche bioadhäsive Komponente einen zelladhäsiven 60

Mikroorganismus aufweist, der genetisch derart verändert ist, daß er wenigstens einen Wirkstoff während oder vor der Applikation selbst produziert.

3. Arzneistoffzubereitung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der zelladhäsive Mikroorganismus der natürlichen bioadhäsiven Komponente ein natürlich vorkommender, apathogener Keim ist.

4. Arzneistoffzubereitung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der natürlich vorkommende, apathogene Keim ein Stamm der Spezies *Escherichia coli* ist.

5. Arzneistoffzubereitung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der natürlich vorkommende, apathogene Keim aus der Gruppe der Milchsäurebakterien ist.

6. Arzneistoffzubereitung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der zelladhäsive Mikroorganismus der natürlichen bioadhäsiven Komponente ein natürlich vorkommender, pathogener Keim ist, bei dem die Expression der pathogenen Strukturen unterdrückt worden ist.

7. Arzneistoffzubereitung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der zelladhäsive Mikroorganismus durch geeignete Behandlung in einer nicht mehr vermehrungsfähigen Form vorliegt.

8. Arzneistoffzubereitung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der zelladhäsive Mikroorganismus der natürlichen bioadhäsiven Komponente ein neuartiger Mikroorganismus ist, der durch Transfektion rekombinanter Gene in einen geeigneten Wirtsorganismus erhalten wird.

9. Arzneistoffzubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der zelladhäsive Mikroorganismus in physikalischer, chemischer oder biochemischer Weise an den Wirkstoff gekoppelt ist.

10. Arzneistoffzubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der zelladhäsive Mikroorganismus über ein chemisches und/oder physikalisches Verbindungselement mit dem Wirkstoff verbunden ist.

11. Arzneistoffzubereitung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das chemische und/oder physikalische Verbindungselement die Freisetzung des Wirkstoffs aus der Arzneistoffzubereitung zeitabhängig und/oder in Abhängigkeit physiologischer Bedingungen steuert.

12. Arzneistoffzubereitung nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß das chemische und/oder physikalische Verbindungselement ein bioadhäsives Polymer ist.

13. Arzneistoffzubereitung nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß das chemische und/oder physikalische Verbindungselement ein bivalenter Antikörper mit Bindungsstellen für den zelladhäsiven Mikroorganismus und den Wirkstoff ist.

14. Arzneistoffzubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff über eine kovalente chemische Bindung an den zelladhäsiven Mikroorganismus gebunden ist.

15. Arzneistoffzubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff über eine glykosidische Bindung oder eine Esterbindung an die natürliche bioadhäsive Komponente gebunden ist.

16. Arzneistoffzubereitung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Arzneistoffzubereitung zusätzlich wenigstens einen Hilfsstoff aufweist.

17. Arzneistoffzubereitung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Hilfsstoff ein Penetrationsbeschleuniger und/oder ein Enzyminhibitor ist.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

PHARMACEUTICAL PREPARATION WITH NATURAL BIOADHESIVE
COMPONENT

DESCRIPTION

This invention relates to pharmaceutical preparations with a natural bioadhesive component. Bioadhesion is understood as the property of certain materials to accumulate on living surfaces. Pharmaceutical preparations with a bioadhesive component are used in particular to achieve an adhesion of the pharmaceutical to the mucous membrane provided for application purposes, thereby prolonging the time for which the pharmaceutical is retained at the site of absorption and/or action.

The biological availability of pharmaceuticals, i.e., how many are present at the site of action or in the central blood circulation system and how fast they are delivered there, depends in particular on the property of a certain pharmaceutical to overcome or penetrate into biological barriers, e.g., mucosal tissue. The crucial factors here are the concentration of pharmaceutical at the absorption site, along with the time for which the pharmaceutical is available for absorption processes in proximity to this mucous membrane. With respect to pharmaceuticals that do not have to be systemically absorbed to exert an effect (e.g., local anti-inflammatory agents, antibiotics or antimycotics), only the time for which they are retained at the site of application or action is important.

A distinction must basically be made between pharmaceuticals that are administered orally, and have the gastrointestinal mucosa as the site of absorption or action, and those used on other mucous membranes, e.g., the nasal, ocular, oral, rectal or vaginal mucosa, whether locally or systemically.

Oral pharmaceuticals exhibit essentially two different therapeutic mechanisms. In the first, they are absorbed at the site of application, the gastrointestinal mucosa, get into the central blood circulation system and there exert a systemic effect. In the second, they are intended to exert a local pharmacological effect relating to the mucous membrane itself or the content of the lumens within the gastrointestinal canal, which in this instance represents the site of action.

With regard to pharmaceuticals that are used on mucous membranes other than the gastrointestinal mucosa, in particular the mucous membrane of the nose, eye, mouth, rectum or vagina, there exist some which exhibit a local effect after application, and others which are absorbed after application to exert a systemic, pharmacological effect.

These pharmaceuticals, which can be applied directly to the mucous membrane in question or using applicators provided for this purpose, and then be absorbed there or exert their effect, are not limited in terms of pharmaceutical action by a poor accessibility of the mucous membrane.

However, the retention time at the site of absorption or action is crucial for efficacy for these pharmaceuticals as well. For example, a pharmaceutical applied in the eye is diluted and rinsed out after a few minutes by lacrimal fluids. There is a rapid drop in the concentration of active substance critical for both the local efficacy and absorption of the pharmaceutical into the blood circulation system.

Therefore, the objective for all mentioned pharmaceuticals, both orally administered and applied directly to the respective mucous membranes, is to improve the biological

availability by prolonging the retention time of the pharmaceutical at the site of absorption and/or action.

This extended period of contact between the mucous membrane and pharmaceutical improves the resorption or increases the active substance concentration of the pharmaceutical at the site of absorption or action in comparison to known pharmaceutical preparations with comparable active substance content. As a result, the necessary quantity of pharmaceutical in the pharmaceutical preparation can be reduced, making it possible to minimize or avoid side effects of the pharmaceutical. The costs of the pharmaceutical preparation can also be lowered by reducing the quantity of pharmaceutical in the pharmaceutical preparation. Further, a pharmaceutical concentration that reflects the concentration of preparations in prior art or is elevated relative thereto can reduce the dose frequency, and hence ensure better patient compliance.

So-called retard- or controlled release (CR) preparations for prolonging the retention time of pharmaceuticals at the site of absorption and/or action have been available for several years already. Various technologies are used in these preparations to achieve a delayed pharmaceutical release, e.g., coating with or embedding in suitable polymers. However, the disadvantage to CR preparations is that the retention time of the preparation itself at the site of absorption or action is not extended, but only the time for which the pharmaceutical is released. Critical for pharmaceutical efficacy, this retention time of the CR preparation at the site of absorption or action is made relatively short by physiological processes. For example, liquid or colloidal preparations administered in the eye are generally excreted with lacrimal fluid within a few minutes. The retention time of orally applied preparations normally does not exceed 24 hours in all within the gastrointestinal tract (GI tract). The average retention

time of a preparation in the small intestine, where most pharmaceuticals are absorbed, only measures roughly 3 hours.

Known from PCT/WO 85/02092 is to prolong the retention time of CR preparations at the site of absorption and/or action and improve the transport of poorly absorbed pharmaceuticals (in particular peptides and proteins) through the epithelium using so-called bioadhesive pharmaceutical preparations. This publication describes the use of synthetic polymers with muco- or bioadhesive properties, e.g., cross-linked polymers of acrylic and methacrylic acid. Because they are water-insoluble and swellable, these polymers trigger an adhesion of the pharmaceutical to the skin or mucous membrane, and thereby are meant to prolong the time of contact between the pharmaceutical and skin or mucous membrane. However, the problem involved in the use of such synthetic bioadhesives is that the interaction with the biological substrate, e.g., the surface of epithelial cells or mucous layer lying thereon, is based solely on non-specific, physicochemical interactions, e.g., H bridges, van der Waals forces or hydrophobic effects. Due to the non-specific bonding, these preparations exhibit the disadvantage of becoming bound to materials other than the skin or mucous membrane cells at the site of absorption or action as the result of interactions, e.g., mucous, microorganisms or nutritional constituents, and hence being inactivated before even reaching the mucous membrane. In addition, the average renewal rate (turnover time) of the intestinal mucous gel layer only measures a few hours, so that the time for which such a system adheres to the cells of the mucosa ends up remaining limited to this relatively short renewal period, even as the result of effective mucoadhesion.

In order to surmount the mentioned disadvantages of synthetic mucoadhesives, PCT/WO 90/09963 discloses the use

of natural bioadhesives in place of synthetic materials. Within the scope of this application, natural bioadhesives are materials that are isolated from the outer surface of microorganisms and adhere to the intestinal wall, along with synthetically fabricated variants, analogs or fragments of such materials. In particular the surface proteins of various E. Coli strains as contained in the fimbria or pili of these strains are described as natural bioadhesives therein.

Even though the use of specific bioadhesives has yielded promising results in terms of bacterial adhesion factors, in vitro and in several animal experiments, difficulties have been encountered in the further development of this concept. For still unexplored reasons, the use of isolated adhesion factors is evidently not yet suited for bringing about lasting bioadhesion in vivo of the kind that can be observed in living microorganisms capable of reproduction, for example in the intestinal wall.

The object of this invention is to provide pharmaceutical preparations that exhibit a lasting bioadhesion and extended retention time at the site of absorption and/or action, and avoid the mentioned disadvantages to the known natural and synthetic bioadhesives, e.g., non-specific adhesion to various substrates.

This is achieved according to the invention by a pharmaceutical preparation for application on mucous membranes with at least one active substance and at least one natural bioadhesive component, which exhibits an adhesive effect on the mucous membrane provided for application purposes, wherein the natural bioadhesive component exhibits a cellular adhesive microorganism.

In this case, it is of particular importance with respect to the adhesive effect improved according to the invention.

that the natural bioadhesive component does not exhibit isolated fragments of a microorganism as known from prior art, but the microorganism itself as a uniform, complete structure, in which it is also present in natural form.

In addition, the object of the present invention is to provide a pharmaceutical preparation that exhibits at least one bioadhesive component, wherein this component exhibits a cellular adhesive microorganism genetically altered in such a way as to produce at least one active substance during or before application itself.

For example, it is possible to combine an insulin or even vitamin-producing microorganism that already constitutes part of prior art with a cellular adhesive microorganism, itself already known in the art too, in such a way as to yield a genetically altered microorganism that embodies the properties of both used microorganisms.

The active substance in the pharmaceutical preparation must be selected based on the medical indication of the preparation. In this case, all pharmacologically active substances are basically suitable for the preparation according to the invention, in particular:

- a) smaller molecules of an organochemical origin, e.g., substances for treating cardiovascular diseases, endocrine or mental diseases, antibiotics, antimycotics or chemotherapeutics, in particular substances from the following active substance groups:

hydroxylated hydrocarbons and compounds thereof;
carbonyl compounds, mono- and disaccharides;
aliphatic and aromatic carbonic acids, along with their esters, lactones, amides, imides, nitriles;
amino acids, acylated amino acids, aminocarbonic acids, amino sugars;

carbonic acid esters, e.g., urethanes, thiourethanes, urea and derivatives, guanidine derivatives, hydantoins, barbituric, thiobarbituric acid derivatives;

aromatic and heteroaromatic nitro compounds;

aliphatic and aromatic amines, phenyl alkyl amines, hydroxyphenyl ethanolamines, quaternary ammonium compounds, amino glycosides;

penicillins, cephalosporins, chloramphenicol, polyene antibiotics;

thiols, sulfonic acid esters, sulfonamides;

pyrazol, pyrazolidine, imidazol, imidazoline, pyridine, pyrimidine, piperidine, pyridazine, pyrazine, piperazine, indole, purine, xanthine, quinoline, isoquinoline, quinazoline, triazine, benzopyridazine, pteridine, benzodiazepine, lysergic acid derivatives, tricyclic N heterocyclene;

thiadiazine, phenothiazine derivatives;

semicarbazones;

cromoglycic acid and its derivatives;

ethacridine;

vitamins and their derivatives;

b) natural or biotechnologically prepared peptides, peptide hormones and proteins, e.g., insulin, calcitonin, growth hormone, LHRH, erythropoietin, interferon, granulocyte-stimulating factor, tumor-necrosis factor, including derivatives, agonists and antagonists of these substances, along with antigens for vaccination.

c) oligo or polynucleotides for gene-therapy applications, e.g., antisense nucleotides, with the objective of blocking the generation of undesirably or incorrectly expressed proteins in body cells, or gene vectors plasmids, which are introduced into

body cells to there correct the expression of missing or faulty genes, or generate therapeutically indicated proteins (e.g., tumor necrosis factor, interferons, interleukins, etc. in the body cells themselves.

The cellular adhesive microorganism of the natural bioadhesive component that is to attach the pharmaceutical preparation to a mucosal surface of the human body for a prolonged time can be selected according to claim 3 from the group of naturally occurring apathogenic germs.

In this case, naturally occurring, apathogenic germs from a strain of the *Escherichia coli* species according to claim 4 are suitable, or those from the group of lactic acid bacteria according to claim 5.

It is also conceivable, based on the embodiment described in claim 6, to use a naturally occurring, pathogenic germ, in which the expression of pathogenic structures has been suppressed. The microorganism can be attenuated, i.e., its pathogenic properties can be weakened, by suppressing the expression of pathogenic, e.g., toxic structures as the result of certain culture conditions, genetic alterations or selection of randomly mutated clones.

In addition, it is conceivable to alter a microorganism that had previously been capable of reproducing through a suitable treatment in such a way that it is present in a form no longer able to reproduce. This can also suppress the pathogenicity of an originally pathogenic microorganism to a degree making it suited for use in accordance with the invention.

With respect to the manufacture of attenuated microorganisms and microorganisms no longer capable of reproduction, reference is made to the usual procedures

from prior art, for example procedures for reducing the germ count according to the German pharmacopoeia, the procedures known from the foodstuffs industry for sterilizing foods under high pressures, or pasteurization procedures in milk processing.

The use of new microorganisms obtained through the transfection of recombinant genes in a suitable host organism as cellular adhesive microorganisms of the naturally bioadhesive component according to claim B is another advantageous configuration of the mentioned invention.

The way in which the active substance is coupled to the cellular adhesive microorganism is also of crucial importance. This type of coupling can be used to control the release of active substance from the preparation by time (e.g., slow or fast) or as a function of physiological signals (e.g., pH changes, concentration changes of a specific substance in bodily fluids, etc.). This coupling can technically take place in various ways.

For example, the cellular adhesive microorganism can be prepared as a conventional pharmaceutical, e.g., a tablet, a capsule, a suppository or salve, which contains the active substance, microorganism and a physical and/or chemical connecting element. In this case, it is important that the agent and microorganism not separate during or due to the changes that arise while using the preparation at the application site (e.g., swelling, decomposition or dissolution processes), but rather remain coupled together long enough with the help of suitable physical and/or chemical measures. One advantageous processing method here involves intimately binding the active substance and microorganism following the use of the pharmaceutical form under exposure to a physiological parameter, e.g., body temperature or bodily fluid.

Also possible is a physical, chemical or biochemical coupling of active substance and microorganism without using a physical and/or chemical connecting element according to claim 8, 14 or 15, e.g., via physical adsorption, specific receptor-ligand or antigen-antibody interactions, or covalent chemical bond, e.g., an ester bond, a glycosidic bond, an ether bond, an amine, imine or amide bond.

Conceivable chemical and/or physical connecting elements include the polymers described in PCT/WO 85/02092, the natural bioadhesives described in PCT/WO 90/04963, or additionally suited aids, e.g., spacers.

It is also particularly advantageous to form a covalent chemical bond of the active substance via a bivalent antibody that exhibits bonding points for the cellular adhesive microorganism and the active substance.

Another advantageous configuration of the invention also involves the addition of aids to the pharmaceutical preparation. As described in claim 16, suitable aids here include in particular penetration improvers, such as gallic acids, sodium dodecyl sulfate, saponines, azones, middle-chain triglycerides and polyacrylic acid or enzyme inhibitors, such as aprotinin, bestatin, puromycin, bacitracin, polyacrylic acid, EDTA, soybean trypsin inhibitor or sodium glycocholate.

Penetration improvers can be used to accelerate the penetration of the active substance through the mucous membrane selected for application purposes, and hence to increase the active substance concentration present at the site of action. Adding enzyme inhibitors prevents a breakdown of the active substance, for example by digestive enzymes like protease, which raises the share of pharmaceutically effective active substance.

The use of both penetration accelerators and enzyme inhibitors makes it possible to reduce the active substance concentration in the pharmaceutical preparation by increasing the share of actually effective pharmaceutical.

Of course, all cited embodiments relate not just to individual active substances, but can be applied in like manner to mixtures of at least two active substances.

The following embodiment is intended to describe the inventive concept by example, without placing any limitations on additional configurations.

The example relates to a new preparation for the treatment of intestinal mycoses, in particular Candida infections. The preparation consists of an antimycotic active substance, a cellular adhesive microorganism and a bioadhesive, hydrogel-forming polymer, which are together applied as a powder mixture in an enteric-coated capsule.

However, express indication is here made of the fact that the invention is not limited to perorally applied preparations, but rather can basically be used for all tissue surfaces of the body (e.g., the mucous membranes from the digestive tract, respiratory tract or sex organs, the skin or endothelia of specific internal organs or blood vessels). In like manner, the enteric resistance of the capsule formulation described here as an example does make sense in this special case, but is in no way absolutely necessary in all instances of such orally administered preparations.

In this example, the known polyene antimycotic nystatin is used as the active substance. The usual dosage during application of a commercially available, conventional tablet preparation of this active substance e.g., NISTALF, Ardeypharm GmbH, D-Herdecke measures between 1.5

to 6 million IU divided among 3-12 conventional tablets per day over a period of at least two weeks. In the new preparation, approx. 1 million IU per enteric-coated capsule were used.

Reproductive bacteria from the E. coli strain NISSLE 1917 were used as the microorganism in this example. This microorganism is able to colonize the human mucous membrane, but exhibits no enterotoxin or hemolysin formation, and is neither enteroinvasive nor urotoxic. Clinical studies have documented the safety of this microorganism during oral application as a freeze-dried dry mass of reproductive germs in an enteric-coated capsule preparation (e.g., MUTAFLO, Ardeypharm GmbH, D-Herdecke). This bacteria strain was proven effective in a series of intestinal diseases (e.g., acute diarrhea, chronic recurring diarrhea, chronic obstipation, irritable colon, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, etc.) owing to the metabolic activities of this microorganism, which trigger a positive change in the intestinal environment following application (including support of colonocyte metabolism, production of vitamin K, decrease in redox potential and immune stimulation). In light of its favorable effect on intestinal flora, the simultaneous application of the E.Coli strain NISSLE 1917 is also recommended for supporting the antimycotic treatment of intestinal Candida infection with nystatin. In the new preparation, 100 mg of biological dry mass with 25×10^9 reproductive E-coli bacteria from the NISSLE 1917 strain are used per enteric-coated capsule.

The agent is coupled to the cellular adhesive microorganism by means of a bioadhesive polymer, in particular by the carbomer permitted for pharmaceutical applications. A carbomer consists of high-molecular polyacrylic acid, one commercially available preparation being CARBOPOL 294 from BF Goodrich. This preparation is mixed with the active

substance nystatin and the freeze-dried, reproductive germs, and together filled into a enteric-coated capsule. In the new preparation, 500 mg of CAEBOPOL 934 P are used per enteric-coated capsule. However, other dosages and bioadhesive polymers are also possible (e.g., cellulose derivatives, hyaluronic acid, chitosan, etc.).

Mode of operation of the new preparation:

Following oral application of the capsule with a glass of water, passage through the stomach and dissolution of the capsule coating in the intestine, the capsule content is wetted by the intestinal juices. During this process, the strong swellability of the bioadhesive polymer (here: polyacrylic acid) transforms the originally dry powder mixture into a hydrogel, from which the pharmaceutical is slowly released via diffusion. The muco-adhesive properties of the polymer alone would not result in a lasting adhesion to the intestinal mucous membrane and a prolonged passage through the intestine for the reasons mentioned in the introduction. However, the general bioadhesive properties of the polymer allow it to establish a lasting bond with the actual bioadhesive component of the invention beforehand, namely the cellular adhesive, reproducible bacteria *E. coli* from the NISSLE 1917 strain. Therefore, the new development relative to previous applications of bioadhesive polymers is that these do not serve to bond a pharmaceutical form to the mucous membrane, but to bond a pharmaceutical to another living surface, namely that of cellular adhesive, reproductive bacteria.

This preparation according to the invention, which comes about by combining the active substance, the cellular adhesive microorganism (the antimycotic nystatin and the cellular adhesive, reproductive *E. coli* from the NISSLE 1917 strain and a physical and/or chemical bonding

element, offers a number of advantages relative to the pharmaceutical forms known from prior art:

Firstly, coupling the pharmaceutical to a bioadhesive component prolongs the retention time of the components in the intestinal tract. In this way, the orally applied dose of the active substance nystatin remains at the site of action for a longer period of time than following the oral administration of a conventional, non-bioadhesive preparation. As a result, higher active substance concentrations are achieved over longer time spans, and the dosage of the active substance from the new bioadhesive preparation can be reduced relative to conventional preparations. This decreases the substance load for the patient along with the risk of side effects. The scope of the dosage reduction enabled by the new preparation must be determined in clinical studies. However, the dose usual for conventional preparations can also be retained given the good tolerance of all components, so that this dose optimization can also be implemented in clinical studies after the preparation has been approved (phase IV).

Secondly, the active substance is released from the preparation on a delayed basis, namely in such a way as to make the entire applied dose of approx. 1 million IU per dosage unit available slowly, within 24 hours. The coupling to a cellular adhesive microorganism retains the preparation at its site of action (lumen of the bowels), and prevents a premature excretion of the latter. This makes it possible to decrease the dosage frequency of the pharmaceutical from 3 times a day to once daily. In turn, this simplifies application, and hence improves the treatment result.

Thirdly, ingesting only a single oral pharmaceutical form results in the simultaneous application of active substance (anti-mycotic) and microorganism (E. coli, NISSLE 1917).

strain. These components are prescribed in usual treatments, but in separately formulated preparations, i.e., one tablet plus one capsule. The simultaneous administration of both components in a single pharmaceutical form enabled by the invention is easier for the patient, and yields an improved compliance.

Additional possible applications of the present invention involving a pharmaceutical preparation with a cellular adhesive microorganism include:

- a) A formulation for the local application of cytostatics, tumor necrosis factor or suicide genes for the treatment of cancers of the mucous membranes, e.g., uterine carcinoma, by coupling these pharmaceuticals to organisms that adhere to the mucous membrane of the affected organ or prefer its immediate vicinity, e.g., the vaginal mucosa or cervical mucus.
- b) A formulation for the local or systemic application of painkillers or local anesthetics via coupling to microorganisms that adhere specifically to the buccal or gingival mucosa.
- c) A formulation for the systemic application of peptide hormones, e.g., insulin or interferon, via coupling to microorganisms that prefer to colonize the colon.
- d) A formulation for treating inflammatory intestinal diseases, like Colitis ulcerosa or Morbus Crohn, via coupling of suitable anti-inflammatory pharmaceuticals to microorganisms that prefer to colonize inflamed mucous membrane areas.
- e) A formulation for the treatment of inflammatory mucous membrane diseases with gene therapy, wherein

the increased formation of inflammatory mediators, such as interleukins, is suppressed in the affected cells via suitable antisense oligonucleotides, or whose effect is modulated via the controlled expression of proteins with an antagonistic effect.

- f) A formulation for treating cystic fibrosis mucoviscidosis), wherein mucus-dissolving pharmaceuticals or enzymes, such as acetylcysteine or DNase, are coupled to microorganisms that colonize the mucous membrane of the respiratory passages.
- g) A formulation for funneling the CFTR gene into the epithelial cells of the respiratory tract of mucoviscidosis patients via coupling to microorganisms that colonize the mucous membranes of the respiratory passages.

CLAIMS

1. A pharmaceutical preparation for application to mucous membranes, with at least one active substance and at least one natural bioadhesive component, which exhibits an adhesive effect on the mucous membrane provided for application, thereby enabling the accumulation of the active substance on the mucous membrane, characterized by the fact that the natural bioadhesive component exhibits a cellular adhesive microorganism.
2. A pharmaceutical preparation for application to mucous membranes, with at least one natural bioadhesive component, which exhibits an adhesive effect on the mucous membrane provided for application, characterized by the fact that the natural bioadhesive component exhibits a cellular adhesive microorganism genetically altered in such a way that it produces at least one active substance during or before the application itself.
3. A pharmaceutical preparation according to claim 1 or 2, characterized by the fact that the cellular adhesive microorganism of the natural bioadhesive component is a naturally occurring, apathogenic germ.
4. A pharmaceutical preparation according to claim 3, characterized by the fact that the naturally occurring, apathogenic germ is a strain of the *Escherichia coli* species.
5. A pharmaceutical preparation according to claim 3, characterized by the fact that the naturally occurring, apathogenic germ is from the group of lactic acid bacteria.

6. A pharmaceutical preparation according to claim 1 or 2, characterized by the fact that the cellular adhesive microorganism of the natural bioadhesive component is a naturally occurring, pathogenic germ, in which the expression of the pathogenic structures has been suppressed.
7. A pharmaceutical preparation according to claim 1 or 2, characterized by the fact that the cellular adhesive microorganism is present in a form no longer capable of reproduction as the result of suitable treatment.
8. A pharmaceutical preparation according to claim 1 or 2, characterized by the fact that the cellular adhesive microorganism of the natural bioadhesive component is a new type of microorganism that is obtained via the transfection of recombinant genes in a suitable host organism.
9. A pharmaceutical preparation according to one of claims 1 to 8, characterized by the fact that the cellular adhesive microorganism is coupled to the active substance in a physical, chemical or biochemical manner.
10. A pharmaceutical preparation according to one of claims 1 to 8, characterized by the fact that the cellular adhesive microorganism is connected with the active substance via a chemical and/or physical connecting element.
11. A pharmaceutical preparation according to claim 10, characterized by the fact that the chemical and/or physical connecting element controls the release of the active substance from the pharmaceutical

preparation as a function of time and/or physiological conditions.

12. A pharmaceutical preparation according to one of claims 10 or 11, characterized by the fact that the chemical and/or physical connecting element is a bioadhesive polymer.
13. A pharmaceutical preparation according to one of claims 10 or 11, characterized by the fact that the chemical and/or physical connecting element is a bivalent antibody with bonding points for the cellular adhesive microorganism and the active substance.
14. A pharmaceutical preparation according to one of claims 1 to 8, characterized by the fact that the active substance is bound to the cellular adhesive microorganism via a covalent chemical bond.
15. A pharmaceutical preparation according to one of claims 1 to 8 or 14, characterized by the fact that the active substance is bound to the natural bioadhesive component via a glycosidic bond or an ester bond.
16. A pharmaceutical preparation according to one of claims 1 to 15, characterized by the fact that the pharmaceutical preparation additionally exhibits at least one aid.
17. A pharmaceutical preparation according to claim 16, characterized by the fact that the aid is a penetration accelerator and/or an enzyme inhibitor.

ABSTRACT

Described is a pharmaceutical preparation for application to mucous membranes, with at least one active substance and at least one natural, bioadhesive component, which exhibits an adhesive effect on the mucous membrane provided for application, so that the active agent can be accumulated on the mucous membrane. As a result, the active agent exhibits an extended retention time on the site of absorption and/or action. The invention is characterized by the fact that the natural, bioadhesive component has a cellular adhesive microorganism.

Further described is a pharmaceutical preparation for application to mucous membranes with at least one natural, bioadhesive component, which exhibits an adhesive effect on the mucous membrane provided for application, whose natural bioadhesive component has a cellular adhesive microorganism, wherein the microorganism can be genetically altered in such a way that it produces at least one active substance itself during or before application.